

MÉTODOS MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE *Trypanosoma cruzi* EM RESERVATÓRIOS ANIMAIS

Palavras-Chave: *Trypanosoma cruzi*, reservatórios, qPCR

VITOR KLIPEL DA SILVA BERTOLINI, PUC-Campinas - Departamento de Bioquímica e Biologia
tecidual, IB, UNICAMP

Prof. Dr. DIOGO VENTURA LOVATO – PUC-CAMPINAS

Prof. Dr. DANILO CICCONE MIGUEL, Departamento de Biologia Animal, IB – UNICAMP

Prof^a. Dr^a. FERNANDA RAMOS GADELHA (orientadora), Departamento de Bioquímica e Biologia
tecidual, IB – UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A doença de Chagas é uma antropozoonose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, sendo uma das doenças endêmicas mais importantes na América Latina (WHO, 2023). Em 2023 estimou-se que mais de 6 milhões de pessoas estariam infectadas no mundo (OPAS, 2023). É considerada uma doença negligenciada pela falta de recursos governamentais e científicos para sua resolução, afetando principalmente pessoas com baixo poder aquisitivo e com maior dificuldade de acesso aos serviços médicos (Brasil, 2022).

A transmissão do patógeno para o ser humano se dá, especialmente, por vetores, a partir do contato de lesões da pele ou de mucosas com as fezes de insetos triatomíneos infectados (Sangenis *et al.*, 2015). A transmissão oral da doença vem ganhando bastante notoriedade, e se dá pela ingestão de alimentos contaminados com *T. cruzi*, como o caldo de cana e açaí (Filigheddu; Górgolas; Ramos, 2017).

Apenas dois fármacos foram aprovados para tratamento da doença de Chagas: nifurtimox e benzonidazol. Entretanto, os dois fármacos possuem eficácia limitada, devido a resistência de algumas cepas aos mesmos, as individualidades de cada paciente, como susceptibilidade, idade e região de moradia, e a fase clínica no qual o paciente se encontra, sendo ambos mais efetivos na fase aguda. Além disso, a duração do tratamento e as reações adversas, como anorexia, vômitos, diarreia e hipersensibilidade, dificultam a adesão ao tratamento por parte dos pacientes (Pita; Pascutti, 2011). Na maioria dos países endêmicos, inclusive o Brasil, apenas o benzonidazol é aprovado para o tratamento da doença, visto que o nifurtimox foi retirado do mercado por seus notórios efeitos colaterais e eficácia incerta (Junior *et al.*, 2017).

O ciclo biológico do parasita é heteroxênico, alternando entre vertebrados, como marsupiais, roedores, animais domésticos e humanos (Martín-Escolano *et al.*, 2022;), e insetos vetores hematófagos, sendo os principais gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* (Gourbière *et al.*, 2012).

O ciclo de vida do parasito pode ser dividido em três: o silvestre, que ocorre entre os vetores e os animais presentes em seu ambiente natural; o peridoméstico, que é intermediado por animais que se situam próximos dos ambientes domésticos (como roedores) e o ciclo doméstico, que se dá entre o homem e os animais domésticos, os quais atuam como reservatórios importantes para manutenção do respectivo ciclo de vida (Coura; Dias, 2009).

Os reservatórios são espécies animais nos quais o agente etiológico da doença é capaz de se multiplicar e atingir um novo hospedeiro. Nesse processo, o reservatório pode ou não apresentar danos ou sintomas da doença, que depende de um equilíbrio imunológico entre hospedeiro e o agente etiológico (Neves, 2019). Portanto, reservatórios favorecem a rede de transmissão do parasito, uma vez que são capazes de se infectar e passar adiante as formas infectivas (Luiz; Roque; Jansen, 2014).

O monitoramento destes reservatórios se dá a partir de técnicas que detectam a presença do parasita em seu organismo. Métodos para detecção do parasita têm sido desenvolvidos ao longo do tempo, com início em métodos sorológicos, xenodiagnósticos e hemocultura (Coura; Dias, 2009; Portela-Lindoso; Shikanai-Yasuda, 2003), até métodos moleculares mais sensíveis, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), a partir da forma convencional da técnica e de PCR quantitativo (também conhecida como qPCR, *real-time* PCR e PCR em tempo real) (Cummings; Tarleton, 2003; Wincker *et al.*, 1994).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um método de amplificação de DNA *in vitro*, baseado na replicação seletiva de sequências-alvo dentro de uma amostra (Mullis *et al.*, 1986). A técnica de PCR quantitativa (qPCR) se baseia na amplificação de fragmentos específicos de DNA, aliada a uma sonda fluorescente específica para amplificação de DNA. Assim, é possível indicar com precisão a amplificação do fragmento e determinar a quantidade de DNA amplificado (Pierce, 2016). Esta técnica tem sido amplamente utilizada para detecção de *T. cruzi*, visto sua alta sensibilidade e especificidade, sendo então altamente eficaz para a pesquisa do parasita e quantificação deste em amostras biológicas tanto de pacientes quanto de reservatórios (Enriquez *et al.*, 2013; Wehrendt *et al.*, 2019).

O objetivo deste trabalho foi avaliar os métodos moleculares utilizados para detecção de *T. cruzi* em reservatórios animais, a partir da técnica de qPCR disponibilizados na base de dados PubMed no período de 2013-2023. A sensibilidade e especificidade de um par de primers descrito dentre os artigos consultados foi testada, para averiguar a eficiência do método.

METODOLOGIA:

1. **Busca bibliográfica:** Foram feitas duas buscas na base de dados do PubMed. A primeira utilizando os descritores: *Trypanosoma cruzi*, qPCR e *animals*, em que foram encontrados 108 artigos. Foi aplicado um filtro para que o resultado da busca se limitasse a artigos publicados de 2013 a 2023, excluindo, então, 14 artigos. Os títulos e resumos desses artigos foram avaliados e com isso foram considerados 19 artigos, pois atendiam a pergunta de pesquisa.

Para a segunda busca, foram utilizados os descritores: *Trypanosoma cruzi*, qPCR e *reservoirs*. Foram encontrados 20 artigos, e, quando consideramos o período de análise, 2 artigos foram excluídos. Os títulos e resumos desses artigos foram avaliados, e, com isso, foram excluídos 5 e 13 artigos selecionados para a leitura completa. Levando em consideração os resultados das duas buscas, 10 artigos foram comuns à ambas. Assim, no total foram selecionados 22 artigos para leitura completa e elaboração da pesquisa.

2. **Teste de sensibilidade e especificidade de primers:** Teste foi realizado utilizando a sonda SYBRTM Green PCR Mastermix (Applied Biosystems), com primers TCZ-F (5'-GCTCTTGCCACAMGGGTGC-3') e TCZ-R (5'-CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3'). Para o teste de sensibilidade, foi realizada uma diluição seriada, partindo de 100 ng de DNA (epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*) até 0,05 ng. Para testar a especificidade, foram realizados 3 controles negativos para *Leishmania spp.*: *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* (100 ng de DNA para cada um deles). A reação foi acompanhada de um controle positivo (100 ng de DNA de *T. cruzi*) e um controle negativo (com água, sem DNA). Os produtos de qPCR foram analisados em gel agarose 2%, visando a amplificação de um fragmento de 182 pb. Os dados da corrida de qPCR gerados pelo próprio equipamento serão analisados e apresentados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A busca bibliográfica resultou na seleção de 22 artigos, os quais os autores variam na escolha de primers e condições experimentais para aplicação da técnica de qPCR. Algo comum para a grande maioria deles é a ausência de testes de reação cruzada com organismos que, por serem filogeneticamente próximos de *T. cruzi*, podem gerar falsos positivos devido à semelhança genética.

Nesse sentido, foi realizado um teste de sensibilidade, para delimitar a eficiência da detecção de DNA do parasito pelo par de primers, em concentrações decrescentes de DNA. Um teste de especificidade, para observar a presença ou ausência de reações cruzadas, foi realizado com diferentes espécies do gênero *Leishmania*, parasita da mesma família de *T. cruzi* (Trypanosomatidae).

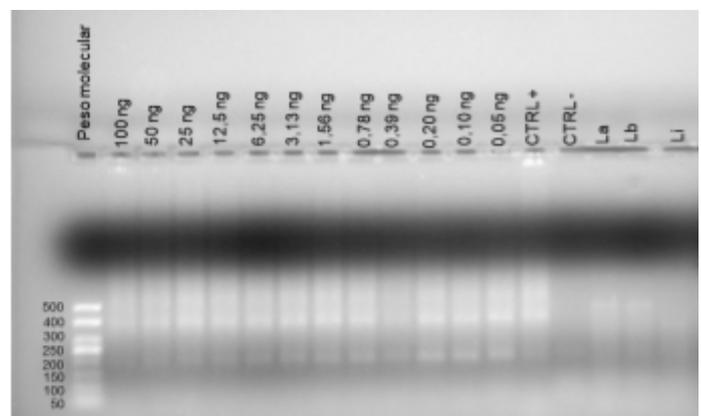


Figura 1 – Produtos de qPCR visualizados em gel de agarose. Peso molecular, seguidos das concentrações de DNA do teste de sensibilidade, Controle positivo, controle negativo e controles negativos para *Leishmania spp.* Fonte: autoria própria.

Os produtos de qPCR foram analisados em gel de agarose (Figura 1), em que foi possível observar que, nas condições experimentais, houve a amplificação do fragmento e de bandas não específicas também. A amplificação não apresentou perfil dose-dependente, porém a eficiência dos *primers* se mantiveram independentemente da concentração de DNA.

Foi possível também observar que, tanto o controle negativo (com água) quanto os controles para *Leishmania spp.* não foram amplificados, evidenciando a especificidade dos primers.

CONCLUSÕES:

Durante o período de 2013-2023 foram publicados 22 trabalhos que utilizaram a técnica de qPCR para detecção de *T. cruzi* em reservatórios animais. Não havia um consenso entre as técnicas, mesmo entre as que utilizavam os mesmos *primers*. Um outro ponto a ser ressaltado é que a maioria não realizou teste com parasitas do gênero *Leishmania*, onde é comum ter reação cruzada com *T. cruzi*. O protocolo de qPCR que adaptamos de uma das referências se mostrou sensível, não teve reação cruzada com 3 espécies de *Leishmania*, mas não foi possível estabelecer uma resposta dose-dependente.

BIBLIOGRAFIA

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Territorialização e vulnerabilidade para doença de Chagas crônica.** Boletim epidemiológico. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2022/boletim-especial-de-doenca-de-chagas-numero-especial-abril-de-2022..>

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, suppl. 1, p. 113-122, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762007000900018>.

COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3-24, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000100001>.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease-100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, suppl. 1, p. 31-40, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000900006>.

CUMMINGS, K. L.; TARLETON, R. L. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 129, n. 1, p. 53–59, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(03\)00093-8](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(03)00093-8).

ENRIQUEZ, G. F. et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* infection in naturally infected dogs and cats using serological, parasitological and molecular methods. **Acta Tropica**, v. 126, n. 3, p. 211–217, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.03.001>.

FILIGHEDDU, M. T.; GÓRGOLAS, M.; RAMOS, J. M. Orally-transmitted Chagas disease. **Medicina Clínica**, v. 148, n. 3, p. 125-131, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2016.10.038>.

GOURBIÈRE, S. et al. Genetics and evolution of triatomines: From phylogeny to vector control. **Heredity**, v. 108, n. 3, p. 190-202, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1038/hdy.2011.71>.

JUNIOR, P. A. S. et al. Experimental and clinical treatment of Chagas disease: A review. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 5, p. 1289-1303, 2017. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0761>.

MARTÍN-ESCOLANO, J. et al. An Updated View of the *Trypanosoma cruzi* Life Cycle: Intervention Points for an Effective Treatment. **American Chemical Society: Infectious Diseases**, v. 8, p. 1107-1115. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00123>.

MULLIS, K. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. **Scientific American**, v. 262, n. 4, p. 56-65, 1990. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/24996713>.

NEVES, D. P et al. **Parasitologia Básica**. 4 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2019.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Menos de 10% das pessoas com Chagas recebem um diagnóstico. **Organização Pan-americana da Saúde**, 13 abr. 2023. Notícias. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/13-4-2023-menos-10-das-pessoas-com-chagas-recebem-um-diagnostico>.

PIERCE, B. A. **Genética: Um Enfoque Conceitual**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

PITA, S. S. R.; PASCUTTI, P. G. Pharmacophore analysis of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase (TR) complexed with peptide mimetic inhibitors. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p. 788–804, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20120057>.

PORTELA-LINDOSO, A. A. B.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. **Revista Saúde Pública**, v. 37, n. 1, p. 107-115, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0034-89102003000100016>.

SANGENIS, L. H. C. et al. Primeiro relato de doença de Chagas aguda por transmissão vetorial no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 4, p. 361–364, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000400017>.

WEHRENDT, D. P. et al. Development and evaluation of a duplex TaqMan qPCR assay for detection and quantification of *Trypanosoma cruzi* infection in domestic and sylvatic reservoir hosts. **Parasites and Vectors**, v. 12, n. 567, p. 1-9, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3817-9>.

WINCKER, P. et al. High correlation between Chagas' disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in Bolivian children living in an endemic area. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, v. 124, n. 3, p. 419–423, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb07318.x>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease (also known as American trypanosomiasis). **World Health Organization**, 6 abr. 2023. Newsroom. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)).